

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
EINES LIPASE-INHIBITORS
AUS PAPAVER SOMNIFERUM

Ilse Dopfer

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatte: Prof. Dr. H. H. Naumann

Mitberichterstatte:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 11. 74

Aus dem biochemischen Laboratorium
(Leitung: Priv. Doz. Dr. K. Hochstrasser)
der Hals - Nasen - Ohren Klinik
der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann)

Isolierung und Charakterisierung eines
Lipasehemmstoffes
aus Papaver Somniferum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelest von
Ilse Dopfer
aus
Landshut

Jahr
1974



ALCANTARA & SUTHERLAND

1. Aufzug des Vorhangs

2. Einleitung des ersten Aktes

3. Die ersten Worte des Helden

4. Die ersten Worte der Heldin

5. Die ersten Worte des Kindes

6. Die ersten Worte des Vaters

7. Die ersten Worte der Mutter

8. Die ersten Worte des Bruders

9. Die ersten Worte der Schwester

10. Die ersten Worte des Onkels

11. Die ersten Worte der Tante

12. Die ersten Worte des Cousins

13. Die ersten Worte der Cousine

14. Die ersten Worte des Nephews

15. Die ersten Worte der Niece

16. Die ersten Worte des Neffen

17. Die ersten Worte der Nichte

18. Die ersten Worte des Onkels

19. Die ersten Worte der Tante

20. Die ersten Worte des Cousins

21. Die ersten Worte der Cousine

22. Die ersten Worte des Nephews

23. Die ersten Worte der Niece

24. Die ersten Worte des Neffen

25. Die ersten Worte der Nichte

Inhaltsverzeichnis

<u>G l i e d e r u n g</u>	<u>Seite</u>
	I - IV
<u>A) Einleitung - Zielsetzung</u>	
1. Stellung des Themas	1
2. Grundlegende Betrachtungen über Enzyme	2
2.1. Stellung innerhalb des Stoffwechsels	2
2.2. Biochemischer Aufbau	2
2.3. Wirksamkeit	2
2.4. Wirkungsweise	3
3. Zur Theorie der Hemmung	4
3.1. Theorie von Michaelis - Menten	4
3.2. Verschiedene Arten der Hemmung	4
3.2.1. Kompetitive Hemmung	4
3.2.2. Allosterische Hemmung	5
3.2.3. Substrat - Produkt - Hemmung	5
3.3. Charakterisierung der Hemmung aus dem Lineweaver - Burk - Diagramm	6
3.3.1. Kompetitive Hemmung	6
3.3.2. Allosterische Hemmung	6
3.4. Unterteilung der Hemmwirkung nach der Art des Wirkungsmechanismus	7
3.4.1. Permanente Hemmung	7
3.4.2. Temporäre Hemmung	7
3.4.3. Progressive Hemmung	7
4. Charakteristik des Enzyms Lipase	8
4.1. Stellung innerhalb des Stoffwechsels	8
4.1.1. Vorkommen im Organismus	8
4.1.2. Aufgaben der Lipase	8

	<u>Seite</u>
4.2. Biochemischer Aufbau	9
4.3. Wirksamkeit der Pankreaslipase	10
4.3.1. Umgebungsbedingungen	11
4.3.1.1. pH - Optimum	11
4.3.1.2. Aktivatoren	11
4.3.1.3. Temperatur	12
4.4. Wirkungsweise	12
4.4.1. Wirkungsspezifität	12
4.4.2. Substratspezifität	13
4.4.3. Reaktionsablauf	14
4.5. Pathogenetische Bedeutung	15
4.5.1. Pathogenese der akuten Pankreatitis	15
4.5.1.1. Auslösende Mechanismen	15
4.5.1.1.1. Reflux von Duodenalinhalt	16
4.5.1.1.2. Spontanaktivierung	16
4.5.1.1.3. Gallereflux	16
4.5.1.2. Die Enzymatischen Prozesse	16
4.5.1.2.1. Proteolytische Enzyme	17
4.5.1.2.2. Lipolytische Enzyme	17
4.5.2. Therapiemöglichkeiten	19
<u>B) Ergebnisse - Arbeitsgang</u>	21
1. Nachweis der antilipolytischen Wirkung im Samen von Schlafmohn	21
1.1. Gewinnung des Rohextraktes	21
1.2. Nachweis der antilipolytischen Aktivität	21
2. Isolierung durch Chromatographie	22
2.1. Dünnschichtchromatographische Vorversuche	22

2.2. Säulenchromatographische Auftrennung des Lipidrohextraktes	22
2.3. Antilipolytische Aktivität der einzelnen Fraktionen	23
2.4. Reinheitsprüfungen der antilipolytisch aktiven Fraktionen	25
3. Hemmgrad	26
4. Hemmcharakteristik	27
4.1. Die Hemmung ist permanent	27
4.2. Die Enzymhemmung ist eine Sofortreaktion	27
4.3. Die Hemmung zeigt pseudo - kompetitiven Charakter	28
5. Alkalische Hydrolyse	28
6. Reinheitsprüfung	29
7. Veresterungsversuche	29
<u>6) Material und Methoden</u>	32
<u>1. Material</u>	32
1.1. Grundmaterial	32
1.2. Laufmittel	32
1.3. Material für die chromatographischen Verfahren	32
1.4. Sprühreagenzien	32
1.5. Material zur Bereitung der Testsubstanzen	32
1.6. Material für die Veresterungsversuche	33
1.7. Material zur Bereitung der Sprühreagenzien	33
<u>2. Methoden</u>	34
2.1. Gewinnung des Lipid - Rohextraktes	34

2.2. Test zum Nachweis der antilipolytischen Aktivität	34
2.2.1. Bereitung der Substanzen	34
2.2.2. Ansätze	35
2.2.3. Auswertung	35
2.3. Versuche zur Isolierung des Hemmstoffes	36
2.3.1. Dünnschichtchromatographisches Verfahren	36
2.3.1.1. Herstellung der Kieselgelplatten	36
2.3.1.2. Verarbeitung der Kieselgelplatten	36
2.3.2. Säulenchromatographisches Verfahren	37
2.3.2.1. Füllen der Säule	37
2.3.2.2. Inbetriebnahme der Säule	37
2.3.2.3. Gewinnung und Verarbeitung der einzelnen Fraktionen	37
2.3.3. Versuch zur weiteren Auftrennung der antilipolytisch aktiven Fraktionen	38
2.4. Versuche zur Charakterisierung des Hemmstoffes	38
2.4.1. Alkalische Hydrolyse	38
2.4.2. Phosphatidnachweis	38
2.4.3. Versuche zur Unterscheidung von Tri-, Di- und Monoglyceriden	40
2.4.3.1. Veresterung mit Palmitinsäure	40
2.4.3.2. Veresterung mit Buttersäure	41
2.4.3.3. Veresterung mit Palmitinsäurechlorid	41
<u>D) Diskussion</u>	42
Zusammenfassung	42

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES LIPASEHEMM-

STOFFES AUS PAPAVER SOMNIFERUM

A) Einleitung - Zielsetzung

1. Stellung des Themas

Bereits mehrere Jahre wurden in Arbeitskreisen um Werle und Hochstrasser der Isolierung von Proteaseninhibitoren aus pflanzlichen, tierischen und menschlichen Geweben gewidmet. Die sowohl physiologisch als auch pathogenetisch bedeutsamen Ergebnisse rechtfertigen bzw. erfordern eine Ausdehnung der Inhibitorforschung auf andere Enzymgruppen.

Die vorliegenden Untersuchungen dienen der Isolierung eines Lipaseinhibitors aus Schlafmohn. Auf der Suche nach natürlichen Lipaseinhibitoren (LI) ging man von folgenden Überlegungen aus: Proteaseninhibitoren (PI) findet man unter anderem in hohen Konzentrationen in eiweißreichen Pflanzensamen. Die in diesen Materialien als Vorratsstoffe gespeicherten Proteine werden vermutlich durch die PI vor unphysiologischem Abbau geschützt. Demzufolge ist die Erwartung naheliegend, daß in fettreichen Pflanzensamen, in denen Lipide als Hauptvorratsstoffe gespeichert sind, antilipolytische Systeme vorhanden sind. Tatsächlich wurde in Lipidextrakten aus Samen von *Arachis hypogaea*, *Brassica napus* var. *arvensis* und *Papaver somniferum* antilipolytische Wirkung festgestellt. Nachdem die Isolierung eines derartigen Inhibitors aus den Lipiden von *Arachis hypogaea* bereits gelungen ist (1)

befaßt sich diese Arbeit mit der Isolierung und Charakterisierung eines ähnlichen Inhibitors aus *Papaver somniferum*.

2. Grundlegende Betrachtungen über Enzyme

2.1. Stellung innerhalb des Stoffwechsels

Enzyme gehören zu einer biologisch besonders wichtigen Gruppe der Proteine, bzw. Proteide. Ein geregelter Ablauf des Stoffwechsels ist an die exakte Wirkungsweise der Enzyme gebunden. Jeder Schritt dieser äußerst komplizierten Reaktionszyklen benötigt ein spezielles Enzym.

2.2. Biochemischer Aufbau

Jedes einzelne Enzym ist charakterisiert durch die Anzahl und Folge der Aminosäuren (Primärstruktur), den räumlichen Bau (Kettenkonformation=Secundär- und Tertiärstruktur) und die Art der Zusammensetzung aus Untereinheiten (Quartärstruktur).

2.3. Wirksamkeit

Maßgebend für die Wirksamkeit eines Enzyms sind das Vorhandensein eines oder mehrerer aktiver Zentren, sowie Vorkommen und Zahl sog. reaktiver Gruppen. Ein derartiges "aktives Zentrum" besteht aus einem bestimmten, besonders gefalteten Teil der Polipeptidkette; unter "reaktiven Gruppen" versteht man die polaren und geladenen Gruppen, die sich an der Oberfläche des Enzymmoleküls befinden. Alle reaktiven Gruppen eines Enzymmoleküls, besonders aber die des aktiven Zentrums selbst, können an einer enzymatisch katalysierten Reaktion teilnehmen. Voraussetzung für die Entfaltung der

Wirksamkeit ist die Bildung eines Enzym - Substrat - Komplexes, wobei es zur Ausbildung einer großen Zahl von Nebenvalenzbindungen, in seltenen Fällen auch von Hauptvalenzbindungen, zwischen den aktiven Zentren des Enzyms und den jeweiligen. korrespondierenden reaktiven Zentren des Substrats kommt. Die Größe des Enzym - Substrat - Komplexes ist sowohl von der Konzentration des Enzyms als auch von der des Substrats abhängig. Eine nicht geringe Bedeutung für die Wirksamkeit haben gewisse Umgebungsbedingungen, wie pH, Temperatur, und das Vorhandensein spezieller Aktivatoren.

2.4. Wirkungsweise

Das Enzym ist in der Lage, ganz gezielt die Richtung der Reaktion zu bestimmen, d.h. es entscheidet darüber, welche von zahlreichen, möglichen Reaktionen das Substratmolekül eingeht. (Wirkungsspezifität).

Vom thermodynamischen Standpunkt aus wären zahlreiche Umwandlungen möglich, doch setzt das Enzym nur für eine spezielle Reaktion die Aktivierungsenergie soweit herab, daß es zu einer Reaktion in Richtung auf das Fließgleichgewicht kommt.

Ferner äußert sich das Auswahlprinzip der Enzyme darin, daß nicht jedes Substrat, das in eine bestimmte Richtung umgesetzt werden kann, gebunden wird (Substratspezifität). Das Ausmaß der Substratspezifität ist von Enzym zu Enzym sehr verschieden. Manche Hydrolasen z.B. sind relativ unspezifisch, andere weisen Gruppenspezifität aus, wieder andere wirken sehr spezifisch auf bestimmte Substrate (2).

3. Zur Theorie der Hemmung

3.1. Theorie von Michaelis - Menten

Als Maß für die oben beschriebene Wirksamkeit ist die Reaktionsgeschwindigkeit anzusehen (Reaktionsgeschwindigkeit = Stoffumsatz/Zeiteinheit), die sowohl bei der Bildung des Enzym - Substrat - Komplexes, als auch bei der Spaltung des Substrats in seine Abbauprodukte, in Abhängigkeit von den jeweiligen Konzentrationen, gemessen werden kann.

Michaelis - Konstante: Als Bezugspunkt wird die halbmaximale Geschwindigkeit gewählt.

K_m = (S) halbmaximale Geschwindigkeit

Die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist, ist gleich der Dissoziationskonstanten des Enzym - Substrat - Komplexes.

3.2. Verschiedene Arten der Hemmung

3.2.1. Kompetitive Hemmung

Diese soeben beschriebenen Erkenntnisse lassen sich vollständig auf den Reaktionsablauf dieser Art von Hemmung übertragen, wenn man von der Überlegung ausgeht, daß der Inhibitor für das Enzym ebenso ein Substrat darstellt. Hemmstoff und Substrat konkurrieren um die Bindung am aktiven Zentrum des Enzyms, was eine strukturelle Ähnlichkeit von beiden voraussetzt.

Man kann die Hemmstoffbindung durch die Inhibitor-konstante

$K_I = \frac{(E) (I)}{(EI)}$ in Analogie zur Substratkonstanten ausdrücken.

Die Konkurrenz unterliegt dem Massenwirkungsgesetz: Erhöhung der Hemmstoffkonzentration bewirkt eine Verdrängung des Substrats und somit eine Blockierung der Reaktion. Erhöhung der Substratkonzentration führt wiederum zu einer Verdrängung des Inhibitors.

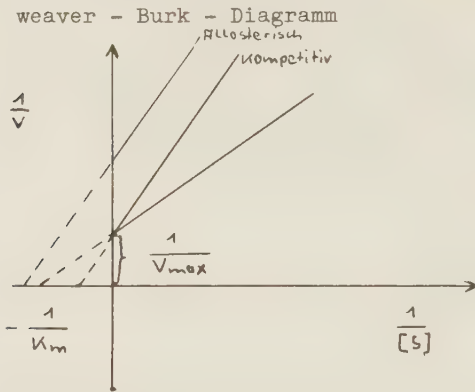
3.2.2. Allosterische Hemmung

In diesem Fall wird der Inhibitor an einem anderen Ort des Enzymmoleküls gebunden als das Substrat. Die reversible Bindung des Inhibitors ändert die Konformation des Proteins so, daß die Bindung des Substrats erschwert oder ganz verhindert wird (Erhöhung von K_S) und die Katalyse selbst auch langsamer verläuft (Erniedrigung von $V_{\max}$).

3.2.3. Substrat - und Produkthemmung

Manche Enzyme reagieren bei sehr hohen Substratkonzentrationen langsamer; es lagern sich vermutlich mehrere Substratmoleküle an ein Enzymmolekül. (Substrathemmung) In ähnlicher Weise können die Endprodukte der Reaktion in höherer Konzentration hemmend wirken, da das Endprodukt das Substrat für die Rückreaktion liefert. (Produkthemmung)

3.3. Charakterisierung der Hemmung aus dem Line-



Zur experimentellen Ermittlung von K_m dient eine Gleichung, deren reziproke Werte in diesem Diagramm aufgetragen sind:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{V_{max}}$$

$y = a \cdot x + b$ (Funktion einer Geraden)

Aus den Koordinaten lassen sich V_{max} und K_m leicht ermitteln.

3.3.1. Kompetitive Hemmung

$\frac{1}{V_{max}}$ bleibt gleich; die Steigung wird um so größer, je mehr Inhibitor zugesetzt wird.

3.3.2. Allosterische Hemmung

In Gegenwart des Inhibitors findet man einen größeren

$\frac{1}{V_{max}}$ - Abschnitt und eine größere Steigung.

3.4. Unterteilung der Hemmwirkung nach der Art des Wirkungsmechanismus

Aufgrund seiner Ergebnisse wurden von Laskowski die Begriffe der temporären und permanenten Hemmung eingeführt.(4)

3.4.1. Permanente Hemmung

Man spricht von permanenter Hemmung, wenn ein Enzym - Inhibitor - Komplex auch nach längerer Inkubation oder Enzymüberschuß nicht in freies Enzym und Spaltprodukte zerfällt.

3.4.2. Temporäre Hemmung

Temporäre Hemmung liegt dann vor, wenn es zu einer reversiblen Spaltung einer bestimmten Peptidbindung im reaktiven Zentrum des Inhibitors durch das zu hemmende Enzym kommt.

3.4.3. Progressive Hemmung

Nach der Art des Wirkungsmechanismus weisen die Inhibitoren des Serums einen dritten Hemmtyp auf. Bei diesen langsam reagierenden Inhibitoren spricht man von progressiver Hemmung. Das Erreichen des Gleichgewichts nimmt Stunden in Anspruch. Die Reaktion ist streng temperaturabhängig (25.- 37°C). Die Komplexbildung ist irreversibel. (3)

Laskowski untersuchte speziell eine Reaktion, bei der ein Proteinaseninhibitor mit Trypsin einen Komplex bildet.

4. Charakterisierung des Enzyms LIPASE (11)

4.1. Stellung innerhalb des Stoffwechsels

4.1.1. Vorkommen im Organismus

Lipasen sind weit verbreitet. Man findet sie in der Leber, im Magensaft, in der Darmwand und vor allem im Pankreas. Die größte Bedeutung im menschlichen Organismus hat die Pankreaslipase.

4.1.2. Aufgaben der Lipase

Die Hauptaufgabe der Lipase und dabei wiederum vor allem der Pankreaslipase, besteht in der Spaltung der Fette bei der menschlichen Verdauung. Die anderen Lipasen spielen dabei eine geringfügige Rolle und unterscheiden sich auch sehr stark von der spezifischen Wirkungsweise der Pankreaslipase. Die Lipase des Magens z.B. greift im wesentlichen Tributyrine an, die der Darmwand spaltet nur β -Glyceride. Trotz der äußerst geringen Wirksamkeit dieser beiden Lipasen ist anzunehmen, daß die erhaltene Fettresorption nach Ausfall der Pankreaslipase auf deren Wirkung zurückgeht. Fehlen oder Verminderung der Pankreaslipase führt zu schweren Störungen der Fettresorption, die sich unmittelbar im erhöhten Fettgehalt des Stuhles ausdrücken. Neben dieser physiologischen Bedeutung kommt der Lipase auch noch eine sehr wichtige pathogenetische Bedeutung zu, wie oben bereits erwähnt wurde und zu späterem Zeitpunkt ausführlich besprochen wird.

4.2. Biochemischer Aufbau und Klassifizierung

Ihrem chemischen Aufbau nach ist die Lipase ein reines, wasserlösliches Protein; sie braucht also zur Entfaltung ihrer Wirksamkeit kein Co-Enzym, wie es bei den Proteiden der Fall ist.

Die Lipase gehört zu den Hydrolasen, und zwar zur Untergruppe der Esterasen. Bei der Gruppe der Esterasen unterscheidet man neben der Gruppe der Lipasen (Glycerinester-Hydrolasen) noch Arylesterasen (Arylester-Hydrolasen) und Carboxylesterasen (Carboxylester-Hydrolasen).

Die Differenzierung der Esterasen erfolgt aufgrund ihrer Hemmbarkeit durch Inhibitoren (z.B. Diisopropylfluorophosphat=DFP oder andere Organophosphate). Die Pankreaslipase ist verhältnismäßig wenig empfindlich gegenüber Organophosphaten; DFP zeigt sogar eine stabilisierende Wirkung. (12) Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat wirkt hemmend. (12,13)

Ein weiterer wichtiger Inhibitor ist Chinin.

Eine andere Differenzierungsmöglichkeit ergibt sich aus der unterschiedlichen Wirkung der Esterasen auf H_2O -lösliche und unlösliche Ester mit Hilfe der Elektrophorese. Die Pankreaslipase unterscheidet sich von den anderen Esterasen weniger durch die Substratspezifität als durch den Dispersionsgrad ihrer Substrate. Auf diesen Zusammenhang wird unten näher eingegangen. Es existiert eine spezielle Lipoproteidlipase, die den Triglyceridanteil der Lipoproteide hydrolysiert, freie Triglyceride dagegen kaum angreift.

Im Gegensatz zu der wenig strengen Substratspezifität sind die Esterasen durch den Besitz einer deutlichen optischen Spezifität ausgezeichnet, die sich in ihrer Wirkung gegenüber optisch aktiven Racematen zeigt. So haben z.B. Untersuchungen der Leberesterasen im Hinblick auf die Konfigurationsspezifität ergeben, daß die Enzyme des Menschen und des Schimpansen sich völlig gleichartig verhalten, während sie bei anderen Affen abweichen. (14)

4.3. Wirksamkeit der Pankreaslipase

Um einzelne Faktoren, die einen Einfluß auf die Wirksamkeit besitzen, näher erläutern zu können, muß in Bezug auf die Wirkungsweise vorweggenommen werden, daß eine Besonderheit der Pankreaslipase darin liegt, daß sie nur auf emulgierte, wasserunlösliche Substrate wirkt. Auch unter diesen speziellen Bedingungen ist die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes Voraussetzung, aus dem heraus die enzymatisch katalysierte Reaktion abläuft. Allerdings müssen die klassischen Vorstellungen von Michaelis und Menten etwas modifiziert werden, da es sich um die Einwirkung eines Enzyms auf wasserunlösliche Substrate handelt.

Entsprechend der Definition der molaren Konzentration löslicher Substrate (Anzahl der Grammküle pro Liter Lösung) handelt es sich bei der "molaren Grenzflächenkonzentration" unlöslicher Substrate um die Anzahl von Grammkülen, welche sich an den Oberflächen der Partikel eines Liters Emulsion befinden. Um auch nur zu

Näherungswerten für diese Grenzflächenkonzentration zu kommen, sind verschiedene Annahmen erforderlich, deren Beschreibung über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen würde. (15)

4.3.1. Umgebungsbedingungen

Diese einzelnen Faktoren haben eine große Bedeutung für die Wirksamkeit der Pankreaslipase.

4.3.1.1. pH - Optimum

Der pH-Bereich, in dem die Pankreaslipase ihre spezifische, katalytische Wirkung entfaltet, liegt bei pH = 8. Sei weist damit einen Extrempunkt auf (ebenso wie z.B. Trypsin bei pH = 7,5-10 oder Pepsin bei pH = 1,5-2,5), denn für die meisten Enzyme liegt das pH-Optimum im neutralen oder schwach sauren Bereich.

Maximale Wirksamkeit, d.h. lipolytische Aktivität, und maximale Bindung zwischen Enzym und Substrat sind keineswegs gleichbedeutend. Beide haben ein verschiedenes pH-Optimum.

4.3.1.2. Aktivatoren

Im Falle der Pankreaslipase ist es richtiger von "Verstärkern" zu sprechen, anstatt von Aktivatoren, denn das Enzym wird bereits in aktiver Form sezerniert.

Verstärkung ihrer lipolytischen Wirkung erfährt sie durch Ca^{++} - und Mg^{++} Ionen, durch bestimmte Polypeptide, Peptide und Aminosäuren, vor allem aber durch die Gallensäuren.

Sie besitzen die Fähigkeit, die hohe Oberflächenspannung zwischen Fett und Wasser herabzusetzen und wirken somit als gute Emulgatoren. Die durch die Emulgierung bewirkte Oberflächenvergrößerung begünstigt wiederum die Wirkung der Lipase.

4.3.1.3. Temperatur

Der optimale Temperaturbereich liegt bei 37°C , wie Versuche nach Reindarstellung des Enzyms zeigten. (16,17)

4.4. Wirkungsweise

4.4.1. Wirkungsspezifität

Bei den Esterasen ganz allgemein liegt das Wesen der Wirkungsspezifität, d.h. des katalytischen Effektes, in der Übertragung einer Acylgruppe auf einen entsprechenden Acceptor, meist auf H_2O . In Anbetracht mancher typischer Esterasen, die nicht nur Carbonsäureesterbindungen spalten, sondern auch Carbonsäureanhydride, Thioester und C-N-Bindungen, scheint als einzige Bedingung für die Spaltbarkeit eines Substrats sicherzustehen, daß der auf den Acceptor übertragene Rest einen doppelt gebundenen Sauerstoff neben der Spaltstelle trägt ($\text{R} - \text{C} = \text{O} - \text{R}_1$).



Paradoxerweise sind Lipasen und andere Esterasen auch zur Biosynthese ihrer Substrate fähig, allerdings nur unter sehr extremen, unphysiologischen Bedingungen. (11)

Die Pankreaslipase katalysiert nur eine ganz spezielle Reaktion, nämlich die Spaltung einer Esterbindung, und zwar der Triglyceride, wodurch unter Aufnahme von H_2O zunächst freie Fettsäuren und Diglyceride entstehen.

Tri-, Di und Monoglyceride werden, mit in dieser Reihenfolge abnehmender Geschwindigkeit, gespalten. Es werden auch Ester einfacher Alkohole, wie z.B. Methylbutyrat, hydrolysiert, wenn sie in Emulsion vorliegen.

4.4.2. Substratspezifität

Hierbei ist als erstes zu erwähnen, daß die Pankreaslipase ausschließlich an der Grenzfläche von Fett und Wasser wirksam werden kann, d.h. nur emulgierte Fette angreifen kann. (Voraussetzungen dazu in vivo siehe oben)

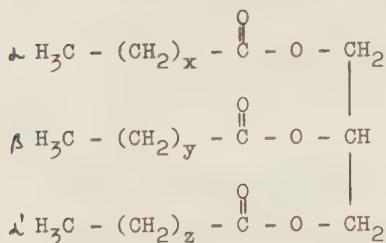
Daß die Pankreaslipase nur unlösliche Ester angreift, wurde in einem früheren Versuch bewiesen:

Bringt man Lipase mit löslichen Estern zusammen, so reagiert sie mit den Molekülen der Lösung gar nicht oder nur sehr geringfügig, was auf eine unvollständige Reinigung schließen läßt. In dem Augenblick aber, wo die Sättigungsgrenze der Lösung überschritten wird und der Ester praktisch in der Form einer Emulsion erscheint, beginnt die Aktivität der Lipase sich zu manifestieren. Die Leberesterase dagegen reagiert nur mit gelösten Estern; ihre Aktivität steigt beim Erreichen der Sättigungsgrenze nicht an.

Bei ungelösten Estern hängt die Aktivität von der Größe der Phasengrenzflächen der Emulsion ab. Wie oben bereits erwähnt, ist also der Dispersionsgrad des Substrats von ausschlaggebender Bedeutung. (15)

"Substrat der Wahl" ist der Ester des Glycerins mit unverzweigten Monocarbonsäuren, vor allem mit der Palmitin- und Stearinsäure. Als dreiwertiger Alkohol kann das Glycerin

Mono-, Di- und Triester bilden. In den Triglyceriden sind meistens zwei oder drei verschiedene Säuren enthalten.



Die natürlich vorkommenden Fette sind stets Gemische zahlreicher Triglyceride. Die Pankreaslipase spaltet nur die α und α' ständigen Fettsäuren ab, während die Lipase der Darmwand auch β -Glyceride angreift. Allerdings werden bereits 75% des Nahrungsfettes als Monoglyceride resorbiert.

4.4.3. Reaktionsablauf

Die Pankreaslipase katalysiert also die hydrolytische Spaltung dieser Esterbindung. Unter H_2O -Aufnahme entstehen dabei ein Diglycerid und eine freie Fettsäure. Man nennt diese Art der Reaktion auch Verseifung. Alkalisches Milieu beschleunigt den Reaktionsablauf ganz erheblich.

Erst das Wissen um all diese biochemischen Daten schuf die Grundlage zur Erarbeitung der im Folgenden beschriebenen Ergebnisse.

Vor der Darstellung der Ergebnisse soll noch auf die bereits weiter vorne erwähnte pathogenetische Bedeutung der Lipase eingegangen werden.

4.5. Pathogenetische Bedeutung

4.5.1. Pathogenese der akuten Pankreatitis (24)

Seit der Jahrhundertwende wird die Autodigestion des Pankreas als das wesentliche pathogenetische Prinzip der akuten Pankreatitis angesehen. Die für das Krankheitsbild charakteristischen, pathoanatomischen Befunde am Pankreas und in seiner Umgebung (Pankreasparenchymnekrosen, Fettgewebnekrosen, Ödeme, Hämorrhagien) lassen sich am ehesten als Folge einer lokalen Wirkung von Verdauungsenzymen deuten. Dem Trypsin wurde dabei bis in jüngste Zeit die größte Bedeutung zugesprochen. Dies wurde jedoch in Frage gestellt, nachdem bei tierexperimentellen Pankreatitiden aktives Trypsin im Pankreas nicht nachgewiesen werden konnte. Es ist deshalb Gegenstand lebhafter Diskussionen geworden, welche Enzyme für die Entstehung der akuten Pankreatitis verantwortlich zu machen sind. In der Pathogenese müssen dabei zwei Vorgänge unterschieden werden:

1. Die auslösenden Mechanismen, die die Verdauungsenzyme im Pankreas aktivieren und
2. die enzymatischen Prozesse, die zur Ausbildung der typischen, pathoanatomischen und pathophysiologischen Veränderungen führen.

4.5.1.1. Auslösende Mechanismen

Normalerweise ist das Pankreas gegen die enzymatische Wirkung seiner Verdauungsenzyme auf verschiedene Weise geschützt: durch die Bildung inaktiver Zymogene der proteolytischen Enzyme und der Phospholipase A, ferner durch die Existenz von Inhibitoren im Pankreasgewebe, Pankreassekret und Serum, die vorzeitig aktivierte Proteasen inaktivieren können.

4.5.1.1.1. Reflux von Duodenalinhalt

Zu einem derartigen, unphysiologischen Verhalten kann es nur durch organische Veränderungen der Papille, funktionelle Störungen der Sphinktermuskulatur und Druckanstieg im Duodenum kommen. Verschiedene Bestandteile des Duodenalsaftes (aktivierte Enzyme, Gallensäuren, Lysolecithine), vor allem aber die Enterokinase sind an der Auslösung einer akuten Pankreatitis beteiligt.

4.5.1.1.2. Spontanaktivierung

Unter gewissen Bedingungen kann eine Spontanaktivierung von Trypsinogen und nachfolgend anderen Zymogenen innerhalb der Zymogengranula eintreten. Auch eine Spontanaktivierung von Phospholipase A wurde beobachtet.

4.5.1.1.3. Gallereflux

Normalerweise ist das Pankreas durch einen höheren Sekretionsdruck geschützt, doch gestatten die anatomischen Beziehungen zwischen Galle- und Pankreasgangsystem unter geänderten Druckverhältnissen einen derartigen Reflux. Möglicherweise führt die, in das Pankreas eingedrungene Galle zu einer solchen Vorschädigung der Zymogengranula, daß eine spontane Autoaktivierung von Trypsinogen eintritt, ehe bei Lyse der Zymogengranula die pankreaseigenen Inhibitoren das initial gebildete Trypsin inaktivieren.

4.5.1.2. Die enzymatischen Prozesse

Wie bei der Beschreibung der auslösenden Faktoren deutlich wurde, muß es auf irgend eine Art und Weise zur Aktivierung von Trypsinogen kommen. Im Folgenden soll nun die Rolle der aktivierten proteolytischen Enzyme, sowie die, der bereits

aktiv vorliegenden (Lipase, Amylase, Nukleasen) bei der Autodigestion untersucht werden. Die Wirkung der verschiedenen Enzymgruppen läßt sich am besten durch Injektion in das Pankreas feststellen.

4.5.1.2.1. Proteolytische Enzyme

Aktives Trypsin führt zur Aktivierung aller anderen proteolytischen Enzyme (Chymotrypsin, Carboxypeptidase, Elastase), sowie auch der Phospholipase A und des Kallikreinogen. Letzteres erklärt die Entstehung massiver, interstitieller Ödeme nach Injektion von aktivem Trypsin. Kallikrein nämlich setzt Kinine frei, deren Wirkungen Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Leucocytenanhäufung und Schmerzerzeugung sind. Es stehen also ganz überwiegend die Zeichen einer Kapillar-, bzw. Gefäßschädigung im Vordergrund. Das bei der akuten Pankreatitis auftretende intra- und peripankreatische Ödem, sowie die häufig zu beobachtenden Hämorrhagien könnten damit erklärt werden. Die Ausbildung der Parenchymnekrose selbst scheint jedoch nicht auf einer proteolytischen Autodigestion der Acinuszellen zu beruhen.

4.5.1.2.2. Lipolytische Enzyme

Während die pathogenetischen Überlegungen bisher fast ausschließlich auf die proteolytischen Enzyme ausgerichtet waren, wurde den lipolytischen Verdauungsenzymen wenig Beachtung geschenkt. Die Betrachtung dieser Enzyme scheint aber insbesondere bei der Annahme eines möglichen Refluxes von Galle oder gallensäurehaltigem Duodenalsaft in den Pankreasgang von Interesse, da sie durch Gallensäuren aktivierbar sind. Auf diese Tatsache wurde bereits weiter vorne hingewiesen.

Durch Instillation von Lipase in das Pankreasgangssystem konnte gezeigt werden, daß Lipase in Gegenwart aktivierender Substanzen (Gallensäuren!) typische Fettgewebnekrosen hervorruft.

Entscheidend für das Auftreten von Parenchymnekrosen ist die Phospholipase A. Als Hauptwirkstoff tierischer Gifte ist sie schon seit langem bekannt, als Verdauungsenzym des menschlichen Pankreas wurde sie erst 1962 nachgewiesen. (22) Phospholipase A katalysiert die Abspaltung einer Fettsäure von Lecithin, Kephalin und weiteren Glycerophosphatiden, wodurch deren Lysoverbindungen gebildet werden, die eine starke Cytotoxizität besitzen. Das Epithel des Dünndarms, in dem die Lysophospholipide eine wichtige Rolle bei der Fettverdauung spielen, ist durch eine Lysophospholipase (Phospholipase B) gegen die toxische Wirkung der Lysophospholipide geschützt. Lecithin und Kephalin sind nämlich Hauptbestandteile der elektronenoptisch nachweisbaren Membranstrukturen der Zelle. Die cytotoxische Wirkung der Lysophospholipide beruht auf ihrer Einlagerung in diese Membranen, die dadurch geschädigt oder aufgelöst werden.

Im Tierversuch konnte nach Injektion einer 2%igen Lysolecithinlösung in den Pankreasgang innerhalb kurzer Zeit eine weitgehende Nekrose des gesamten Pankreas beobachtet werden. Daneben traten schwere Fettgewebnekrosen im gesamten Bauchraum auf.

Diese Versuche charakterisieren eindeutig die Phospholipase A als das, die Autodigestion bewirkende Enzym. Als initialer Zündfunke für die Aktivierung weiterer Zymogene könnten möglicherweise Spuren autokatalytisch aktivierten Trypsins eine

Rolle spielen, die selbst durch die pankreaseigenen Trypsin-inhibitoren rasch inaktiviert und dadurch dem Nachweis entzogen werden.

4.5.2. Therapiemöglichkeiten

Diese ausführliche Darstellung soll den Wandel in der Ansicht über die Pathogenese der Akuten Pankreatitis deutlich vor Augen führen. Die überwiegende Bedeutung der lipolytischen Enzyme, bzw. deren mögliche Inhibierung, machen den Bezug zur Klinik in dieser Arbeit klar. Eine Einführung von Lipase, bzw. Phospholipase A Inhibitoren in die Therapie der akuten Pankreatitis würde die Entstehung der schwerwiegenden Pankreas- und Fettgewebsnekrosen verhindern helfen.

Die Vorrangstellung nimmt jedoch nach wie vor das Trasylol ein, der aus Rinderlunge isolierte Proteaseinhibitor.

Am Rande sei noch eine weitere Therapiemöglichkeit erwähnt: Die günstige Wirkung der Antibiotika auf den Verlauf der Pankreatitis wurde sowohl im Tierexperiment als auch beim Menschen gezeigt. Primär ist die akute Pankreatitis in der Regel keine bakteriell bedingte Entzündung; sekundär jedoch vermag es zur Infektion zu kommen. Es werden Tetrazykline empfohlen, von denen bekannt ist, daß sie die Aktivität der Lipase hemmen.

Diese Tatsache hat in einem anderen Gebiet der Medizin, in der Dermatologie, bei der Behandlung der Akne vulgaris zu einem beachtlichen Erfolg geführt. (27)

In der Ätiopathogenese der Akne vulgaris spielen das Corynebakterium acnes, Staphylokokken und Pityrosporum ovale eine große Rolle. Alle drei genannten Erreger besitzen lipolyti-

sche Aktivitäten und bilden freie Fettsäuren aus Triglyceriden der Talgdrüsenlipide. Die freien Fettsäuren C_{12} - C_{14} sind besonders komedogen. Tetracycline vermindern nicht nur wegen ihrer bakteriostatischen Eigenschaften, sondern auch direkt durch eine Hemmung hydrolytischer Vorgänge die Freisetzung von Triglyceriden aus den Talgdrüsenlipiden.

In Anbetracht der in dieser Arbeit verwendeten Materialien ist es erwähnenswert, das Tetracycline (Tetracyclinhydrochlorid, Demethylchlortetracyclin, Doxycyclin) die Hydrolyse von Olivenölemulsion durch Schweinepankreaslipase vollständig inhibieren. (28)

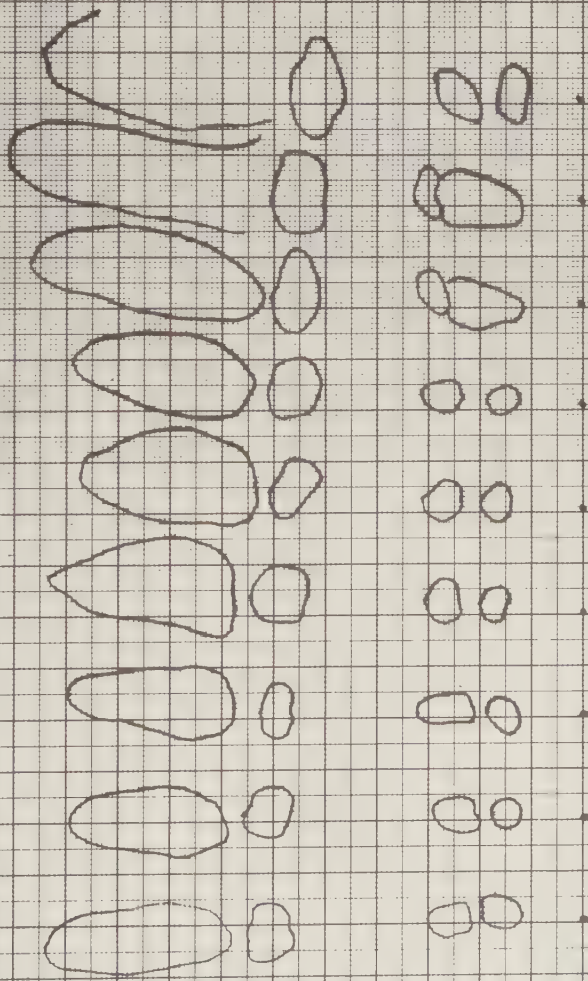
Diese Hemmwirkung wurde nicht nach Penicillin G, Ampicillin, Oxacillin, Erythromycin, Chloramphenicol, Streptomycin und Sulfonamiden gesehen. Daraus wurde gefolgert, daß Tetracycline nicht nur das Hydrolysesystem des Corynebakterium acnes hemmen, sondern auch in nicht bakterielle, hydrolytische Vorgänge eingreifen. Durch einen ausreichenden Antibiotikaspiegel kann die hohe Lipaseaktivität des Corynebakterium acnes blockiert werden. (29, 30)

Vielleicht könnte auch dieser kurze Ausblick in das Fachgebiet der Dermatologie Denkanstöße zu einer möglichen Erweiterung in der Therapie der akuten Pankreatitis liefern.

Eines jedoch ist sicher, nämlich, daß bei dem heutigen Stand der Erkenntnisse über die Pathogenese der akuten Pankreatitis ein therapeutischer Angriff in Richtung auf die lipolytischen Enzyme gemacht werden muß.

Vielleicht können die nun folgenden Ergebnisse einen kleinen Teil dazu beitragen.

File # 100-144164-1189



7	2	2	4	4	6	6	6
---	---	---	---	---	---	---	---

Anzahl der Tropfen pro Staupunkt

Abb. 1

Legende zu Abb. 1

Dünnschichtchromatographische Vorprüfung des Mohn-
- Aceton - Rohextraktes:

Laufmittel: P/D/E 90:10:1 (Petroläther 40-60°)

Sprühmittel: Dichlorfluorescein

Der Rohextrakt wurde in Aceton verdünnt aufgetragen

Fraktion 0

Fraktion I

Fraktion II

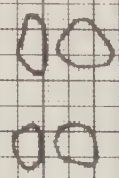
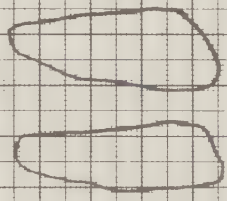
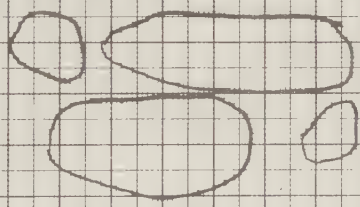
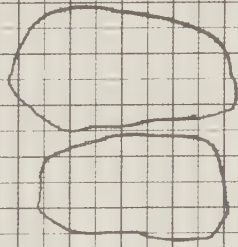
Fraktion III

Fraktion IV

Fraktion V

Anfang
↓

Ende
↓



Legende zu Abb. 2

Darstellung der Dünnschichtchromatogramme der einzelnen Fraktionen:

Aus jeder Fraktion wurden zwei charakteristische Abbildungen gewählt und nebeneinander aufgetragen.

360
340
320
300
280
260
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0

24

Irradiation 0

Irradiation 1

Irradiation 2

Irradiation 3

Irradiation 4

 R_F

0.7

0.6

0.5

0.4

0.3

0.2

0.1

10

120

140

160

180

200

220

240

260

280

300

320

340

360

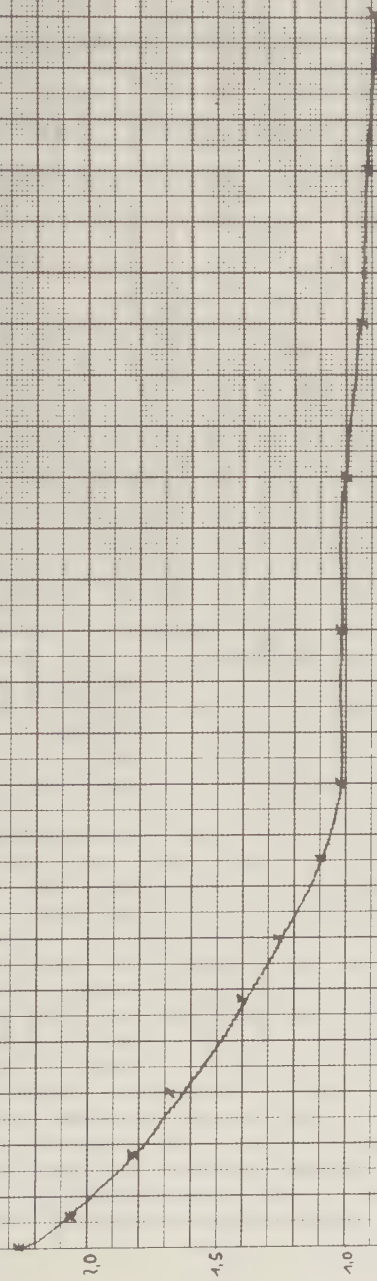
Legende zu Abb. 3

Fraktionierung der Lipide an Kieselgel

Elutionsmittel: P/D/E 90:10:1

Eingezeichnet sind die R_F - Werte der Dünnschichtchromatogramme der betreffenden, von der Säule eluierten Fraktionen.

2.5 ml 0.05 N NaOH



ml Lipid emulsion
plus 40 ml H₂O

Legende zu Abb. 4

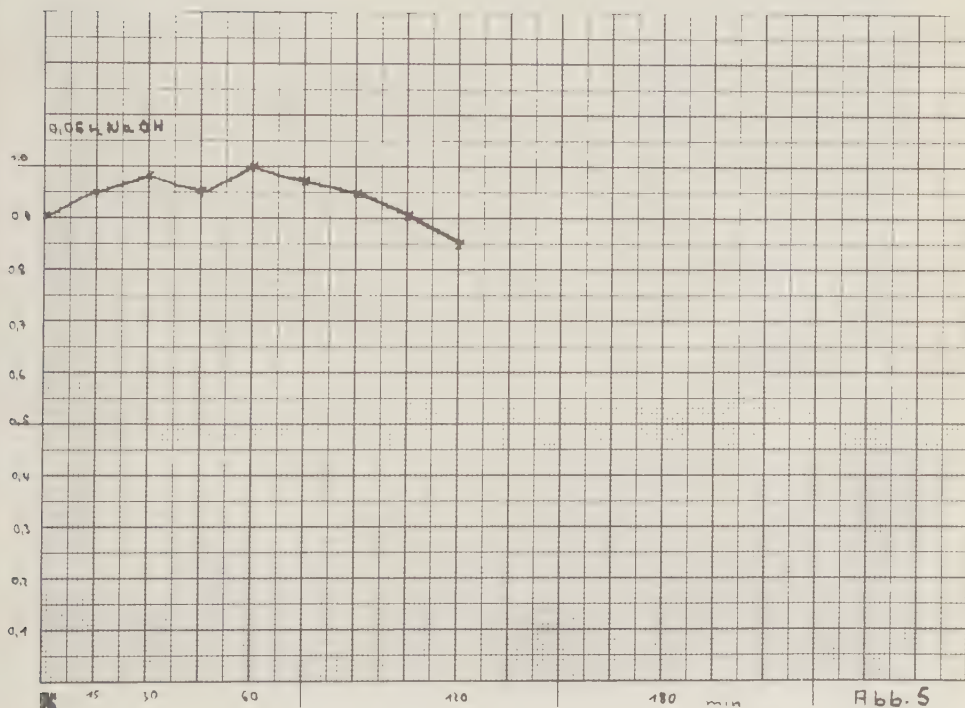
Hemmung der Lipasewirkung durch Lipide aus *Papaver somniferum*:

Im Ansatz freigesetzte Fettsäuren (= Verbrauch an 0,05 n NaOH) mit steigenden Mengen an zugesetztem Hemmstoffhomogenat.

Legende zu Abb. 5

Hemmwirkung in Abhängigkeit von der Dauer der
Inkubation:

Die Ermittlung der antilipolytischen Aktivität
wird im Text ausgeführt.



Legende zu Abb. 6

Nachweis des kompetitiven Charakters der Hemmkurve
aus dem Lineweaver - Burk Diagramm:

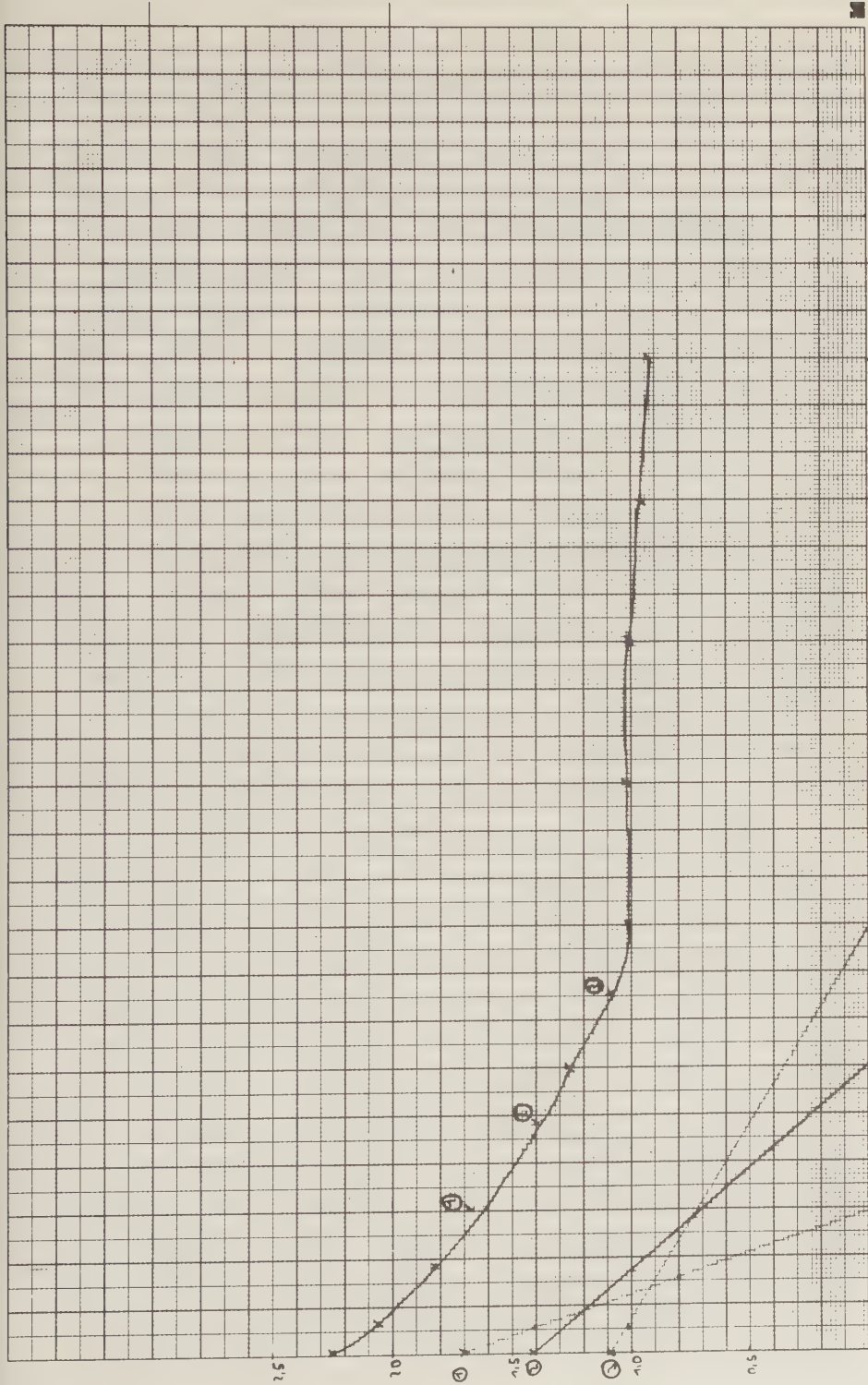
Berechnung der Steigung der Einzelgeraden:

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

$$1. \frac{1,4 - 0,8}{0,25 - 0,10} = -4$$

$$2. \frac{1,0 - 0,6}{0,6 - 0,3} = -1,3$$

$$3. \frac{1,0 - 0,5}{0,8 - 0,1} = -0,7$$



B) Ergebnisse - Arbeitsgang

1. Nachweis der antilipolytischen Wirkung im Samen von Schlafmohn

1.1. Gewinnung des Rohextraktes

Aus einem Mohn-Aceton-Gemisch wird durch Filtration und Vakuumextraktion ein Lipidrohextrakt erhalten, der als Ausgangsmaterial für die folgenden Untersuchungen dient.

1.2. Nachweis der antilipolytischen Aktivität

Wie bereits genau ausgeführt, entfaltet die Lipase ihre Aktivität nur gegenüber emulgierten Fetten. Als Substrat wurde daher Olivenölemulsion angeboten. Um das Aktivitätsmaximum der Lipasewirkung, bzw. der inhibitorischen Wirkung zu erzielen, laufen sämtliche Reaktionen im Bereich des pH und Temperaturoptimums ab. Diese Bedingungen werden erreicht, indem man vor Beginn jedes Versuches das Substrat mit 0,05m Trispuffer (pH = 8,0) im Verhältnis 1:1 mischt und jeden Ansatz 30 Minuten lang im Wasserbad bei genau 37° inkubiert. Um die reine Lipasewirkung zu prüfen, macht man einen Ansatz aus Substrat und Lipase. Die eventuelle inhibitorische Aktivität wird nachgewiesen, indem man von einem kleinen Teil des Rohextraktes eine Lipidemulsion herstellt, sie 15 Min. im Wasserbad vorinkubiert, dann das Substrat hinzu gibt und dieses Gemisch weitere 30 Min. inkubiert. Die Bestimmung der Lipaseaktivität, bzw. deren Inhibierung, erfolgt durch Titration der freigesetzten Fettsäuren mit 0,05m NaOH nach Zugabe von Thymolphthaleinlösung als Indikator. Da jedoch Substrat- und Inhibitoremulsion titrierbare Acidität ent-

halten können, sind Substrat- und Inhibitorleerwerte mitzuführen.

Setzt man die so erhaltene Lipasewirkung gleich 100%, so erhält man eine relative Hemmwirkung von ca. 50%.

Auf diesem ersten, sicheren Ergebnis bauen alle weiteren Versuche auf.

2. Isolierung durch Chromatographie

2.1. Dünnschichtchromatographische Vorversuche

Um die günstigsten Trennbedingungen für das Säulenverfahren zu ermitteln, wurden je 2, 4 und 6 Tropfen des mit Aceton verdünnten Rohextraktes auf Dünnschichtplatten aufgetragen und diese in verschiedenen Lösungsmittelgemischen entwickelt. Zur Auswahl standen verschiedene Gemische aus Petroläther, Diäthyläther und Eisessig:

Petroläther (40° - 60°C)	PDE 90 : 10 : 1
	80 : 20 : 1
	70 : 30 : 1

Petroläther (50° - 70°C) PDE 90 : 10 : 1

Die Mischung aus PDE 90 : 10 : 1 ergab die differenzierteste Auftrennung (siehe Abb. 1). Die einzelnen Lipide wurden nach Besprühen mit Dichlorfluorescein im UV - Licht lokalisiert.

2.2. Säulenchromatographische Auftrennung des Lipid - Rohextraktes

Auf die mit Kieselgel und dem oben ermittelten Lösungsgemisch in äquilibrierter Form angefüllte Säule werden 50g Lipid aufgetragen und fraktioniert eluiert. Aus den

einzelnen Fraktionen werden wiederum einige Tropfen auf Dünnschichtplatten aufgetragen, im selben Laufmittel entwickelt und die Lage der Lipide lokalisiert. Fraktionen, in denen sich Lipide mit gleichem oder ähnlichem R_F -Wert finden, werden vereinigt. Durch dieses Trennverfahren werden fünf verschiedene Fraktionen erhalten, von denen allerdings 2 nur sog. "Zwischenfraktionen" darstellen; d.h. sie bilden den Überlappungsbereich zweier aufeinanderfolgender Fraktionen. (siehe Abb. 2) Die Abbildung zeigt, daß die Fraktionen mit den höheren R_F -werten zuerst eluiert werden. Dabei dürfte es sich bei der am Anfang aufscheinenden Fraktion 0 um ein Artefact handeln. Der mengenmäßige Anteil ist zu vernachlässigen; außerdem ist in dieser Fraktion auch keine antilipolytische Aktivität nachzuweisen. Trägt man die einzelnen Fraktionen nebeneinander auf Dünnschichtplatten auf, so sieht man auch hier besonders deutlich die Überlappungszonen der einzelnen aufeinanderfolgenden Fraktionen. Es handelt sich dabei nicht um fließende Übergänge, da die einzelnen Fraktionen durch ihre R_F -Werte ziemlich scharf getrennt sind. (siehe Abb. 3)

2.3. Antilipolytische Aktivität der einzelnen Fraktionen

Um zu einer relevanten Aussagekraft über die inhibitorische Aktivität der einzelnen Fraktionen zu gelangen, wird die bei einer bestimmten Lipidmenge der jeweiligen Fraktion erzielte relative prozentuale Hemmung auf absolute Werte umgerechnet. Es werden die Gewichtsmengen verglichen, die man von den einzelnen Fraktionen benötigt, um eine 50%ige Hemmwirkung zu erzielen.

Hemmung 50% bei	Frakt.I	Frakt.II	III	IV	V
--	4,20321g	0,481g	0,2563g	0,183g	---

Eine (weitere) Vergleichsbasis ist die Lipidmenge, die man benötigt, um 1mg Enzym 50%ig zu hemmen:

Fraktion O	-----
Fraktion I	2,1016g /mg Enzym
Fraktion II	240,5 mg/mg Enzym
Fraktion III	128,15 mg/mg Enzym
Fraktion IV	91,5 mg/mg Enzym
Fraktion V	-----

Betrachtet man diese Ergebnisse, so liegen folgende Schlüsse nahe:

Die geringe Hemmwirkung, die bereits in der "reinen" Fraktion I nachzuweisen ist (man benötigt 16mal so viel wie z.B. von Fraktion III, um die selbe Wirkung zu erzielen), läßt darauf schließen, daß sie beim Durchlaufen der Säule geringe Mengen von Fraktion III mitgerissen hat.

Fraktion II und Fraktion IV sind die bereits erwähnten "Zwischenfraktionen". Sie beinhalten beide einen Teil der Fraktion III.

Fraktion II besteht ungefähr zu gleichen Teilen aus Fraktion I und III.

Anschaulich ausgedrückt ist hier die Fraktion III auf die Hälfte der Hemmkonzentration "verdünnt", d.h. um mit Fraktion II noch dieselbe Hemmwirkung wie mit Fraktion III zu erzielen, muß die Lipidmenge doppelt so groß sein.

Fraktion IV dagegen weist eine scheinbar größere Aktivität auf als Fraktion III. Die Täuschung dürfte auf dem äußerst geringen Mengenanteil der Fraktion IV an der Gesamtmenge und der daraus resultierenden größeren Fehlerbreite beim Wägeverfahren beruhen. Diese Behauptung stützt ein Vergleich:

Jede Fraktion wird mit 40 ml Lösungsgemisch verdünnt. Für die Zubereitung des Homogenats, das für das in 1.2. beschriebene Testverfahren benötigt wird, wird jeder Fraktion je 5 ml entnommen. Bei Fraktion IV beträgt die Lipidmenge in 5 ml 51 mg, bei Fraktion III 512 mg!

Damit ist wohl eindeutig Fraktion III als die antilipolytisch aktive Fraktion charakterisiert.

2.4. Reinheitsprüfung der antilipolytisch aktiven Fraktion
Die Reinheitsprüfungen erfolgen, wie schon die Vorversuche, durch Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Lösungsmitteln.

Die Gemische aus Petroläther, Diäthyläther und Eisessig waren die selben wie in 2.1. aufgeführt.

Dazu kamen noch:

- a) Aceton
- b) Benzol 50 ml
- Diäthyläther 40 ml
- Äthanol 2 ml
- Eisessig 0,2 ml

Im Anschluß an die Entwicklung in diesem Lösungsmittelgemisch erfolgt eine zweite in

- Hexan 94 ml
- Diäthyläther 6 ml
- c) Chloroform 65 ml
- Methanol 25 ml
- H₂O 4 ml

Entwicklung in diesem Laufmittel erfordert zur Lokalisation der Lipide eine Anfärbung der Platte mit Ammonium - molybdat - Perchlorsäure.

Sämtliche Versuche führten zu einer einheitlichen Darstellung der Fraktion. Somit erwies sich eine Rechromatographie auf einer längeren und dünneren Säule als nicht erforderlich. Dieses Ergebnis ist jedoch noch kein Beweis für das Vorliegen einer einheitlichen Verbindung.

3. Hemmgrad

Um einen Zufallsbefund oder Wirkungen von Effektoren (Diäthyl - p - Nitrophenylphosphat z.B. zeigt bei emulgierten Fetten, nicht dagegen in wässriger Lösung, eine irreversible Hemmwirkung gegenüber Lipase) auszuschließen, wurde der erzielbare Hemmgrad in Abhängigkeit von der zugesetzten Lipidmenge untersucht. Stets gleichbleibenden Mengen von Substrat und Lipase wurden steigende Mengen des inhibitorhaltigen Homogenats zugesetzt. Man erhält mit diesem Verfahren ähnliche Hemmkurven wie sie bei allen Proteasehemmstoffen gefunden wurden. (18)

Bis zu einem Hemmgrad von etwa 50% der erreichbaren Endhemmung ist eine lineare Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration gegeben. Ist die Endhemmung erreicht, so verläuft die Kurve nahezu abszissenparallel weiter, d.h., das Enzym ist mit Inhibitor gesättigt (siehe Abb. 4).

Eine vollständige Hemmung der Lipaseaktivität ist auch bei großem Hemmstoffüberschuß nicht möglich. Der Grund hierfür könnte zum ersten einmal in der Tatsache liegen, daß ein Lipasengemisch vorliegt, in dem nur bestimmte Enzymkomponenten von dem eliminierten Inhibitor angegriffen werden. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Bakterien - und Leucocytenproteasen gemacht. (19)

Hierbei handelt es sich ebenfalls um Gemische, deren Aktivitäten nur zum Teil durch spezifische Inhibitoren gehemmt werden können. Ein weiterer Grund für den charakteristischen Verlauf der Hemmkurve wäre in dem Vorkommen von unspezifischen Esterasen zu suchen, die laut Herstellerfirma zu 20% im verwendeten Lipasepräparat enthalten sind.

4. Hemmcharakteristik

4.1. Die Hemmung ist permanent

In Analogie zu den Ergebnissen, die bei der Erforschung der Proteaseninhibitoren erzielt wurden, lag nun hier die Frage nahe, ob der Lipaseinhibitor in seiner Hemmwirkung Ähnlichkeit mit den Proteaseninhibitoren (P I) aufweist. Wie bei den pflanzlichen PI, die ihrer biochemischen Natur nach hochmolekulare Stoffe sind, ist auch bei diesem, aus Pflanzensamen isolierten LI, die Hemmwirkung permanent, d.h. sie geht auch bei Lipaseüberschuss und längerer Inkubationszeit nicht verloren. Dagegen ist das Enzym bereits nach 3 Stunden zerstört.

4.2. Die Enzymhemmung ist eine Sofortreaktion

Unmittelbar nachdem man die Reaktionspartner zusammenbringt, ist die mit der eingesetzten Hemmstoffmenge erreichbare Inhibierung nachweisbar; sie bleibt auch nach längerer Inkubationszeit konstant.

Diese beiden Ergebnisse veranschaulicht das nachfolgende Diagramm. (siehe Abb. 5)

4.3. Die Hemmung zeigt pseudokompetitiven Charakter

Der Beweis für den kompetitiven Charakter der Hemmung kann aus dem Lineweaver-Burk Diagramm erbracht werden. Laut Definition muss beim Vorliegen einer kompetitiven Hemmung die Steigung der Geraden mit zunehmender Inhibitormenge grösser werden. Wie eine Aufteilung der Geraden, die durch den linear verlaufenden Anteil der Hemmkurve gezogen werden kann, in Einzelgeraden zeigt, nimmt die Steigung in einem Bereich von -4 bis $-0,7$ in Abhängigkeit von der ständig grösser werdenden Inhibitormenge laufend zu. (siehe Abb.6) Nachdem das Steigungsmaximum erreicht ist, geht die Kurve langsam in einen asymptotischen Verlauf über.

Der Begriff der "pseudokompetitiven Hemmung" wurde im Hinblick auf die Grösse der Dissoziationskonstanten geprägt. Bei der kompetitiven Hemmung liegt der Wert zwischen 10^{-2} und 10^{-5} Mol/l. Da der Wert dieser Inhibitor-konstanten sehr niedrig ist (bei 10^{-12} Mol/l), kann man nur mehr von einer pseudokompetitiven Hemmung sprechen; es sind jedoch alle Merkmale einer kompetitiven Hemmung vorhanden.

5. Alkalische Hydrolyse

Hierbei handelt es sich um den Vorgang der alkalischen Verseifung, der bereits weiter vorne als die spezielle, von der Lipase katalysierte Reaktion beschrieben wurde. Nach dieser Vorbehandlung zeigte sich bei dem in üblicher Weise durchgeführten Test auf antilipolytische Aktivität keinerlei Hemmwirkung mehr.

6. Reinheitsprüfung

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie konnte nachgewiesen werden, daß die Verbindung weder Phosphor noch Amine enthält. Die Substanz wurde in Petroläther gelöst und davon jeweils einige Tropfen auf Platten aufgetragen. Als Laufmittel wurden

Chloroform 65 ml

Methanol 25 ml

Wasser 4 ml

verwendet. Die Nachweismethoden unterscheiden sich durch die Verwendung verschiedener Sprühreagenzien.

Ninhydrinlösung diente zum Nachweis von Aminophosphatiden.

Das Dragendorff-Reagens ist speziell für die cholinhaltigen Phosphatide; im Allgemeinen charakterisiert es Alkaloide und andere stickstoffhaltige Verbindungen.

Mit Ammonium-Molybdat-Perchlorsäure als Sprühreagens werden Phospholipide aller Art nachgewiesen.

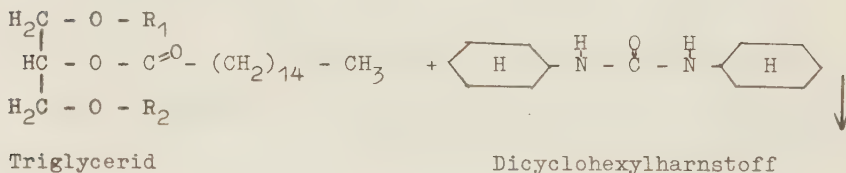
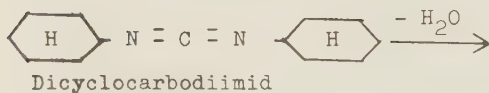
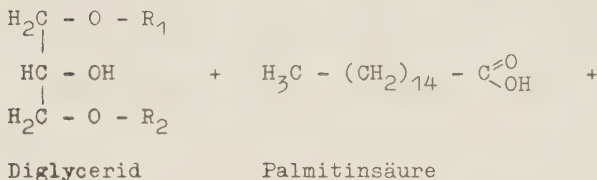
7. Veresterungsversuche

Die folgenden Testverfahren beruhen auf dem Prinzip der Veresterung freier OH - Gruppen.

Die Veresterung erfolgt mit Hilfe eines wasserabspaltenden Reagens, bzw. mit einem Säurechlorid.

Veresterung ist nur möglich, wenn ein Mono- oder Diglycerid mit freier OH - Gruppe vorliegt.

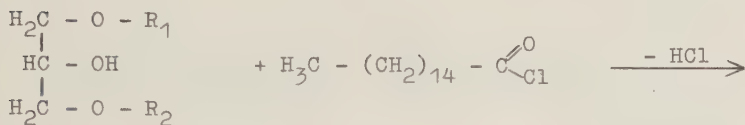
Im ersten Versuch dient Palmitinsäure als Veresterungsmittel und Dicyclocarbodiimid als Reagens.



Die ausgefallene Harnstoffverbindung beweist die stattgehabte Veresterung.

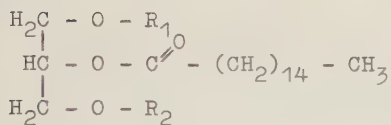
Im zweiten Versuch dient Buttersäure als Veresterungsmittel, Dicyclocarbodiimid wiederum als Reagens. Durch die Verwendung von Buttersäure $\text{H}_3\text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \overset{\text{O}}{\text{C}}\text{OH}$ trat keinerlei Veränderung der Versuchsergebnisse ein.

In diesem letzten Versuch dient Palmitinsäure als Veresterungsmittel.



Diglycerid

Palmitinsäurechlorid



Triglycerid

Bei dem anschließend durchgeführten Test auf antilipolytische Aktivität unterscheiden sich die, dem Versuch unterzogene Probe und die ebenfalls getestete Vergleichssubstanz in ihrer absoluten Hemmwirkung nur um 2%; Veresterung führt nicht zum Verlust der Hemmwirkung; d.h., das wirksame Prinzip ist kein Mono- oder Diglycerid.

C) Material - Methoden

1. Material

1.1. Grundmaterial

Enzym: Lipase aus Schweinepankreas; Produkt von Serva

Mohn: Papaver somniferum; mit Hilfe einer Mohnmühle gemahlen

1.2. Laufmittel

Petroläther (40-60°C) p.A., Merck

Petroläther (50-70°C) p.A., Merck

Diäthyläther p.A., Merck

Aceton p.A., Merck

Benzol, kristallisierbar, p.A., Merck

Äthanol

Eisessig=Essigsäure min. 96% (etwa 1,06) p.A., Merck

n - Hexan, rein, Merck

Chloroform p.A., Merck

Methanol p.A., Merck

Propanol p.A., Merck

1.3. Material für die chromatographischen Verfahren

Kieselgel G nach Stahl für DC, Merck

Kieselgel (0,05 - 0,02 mm) für Säulenchromatographie, Merck

1.4. Sprühreagenzien

2'7' - Dichlorfluorescein, Sprühreagenz für die Chromatographie, Merck

Ninhydrinlösung

Dragendorff - Reagenz

Ammoniummolybdat - Perchlorsäure

} selbst bereitet

1.5. Material zur Bereitung der Testsubstanzen

Titrisol zur Herstellung von 1n NaOH, DBP Nr. 971376, Merck

Trihydroxymethylaminomethan, Merck, Ph. Nord. 1963

Thymolphthalein, Merck, pH: 9,3 - 10,5

Olivenöl

nach DAB 6

Gummi arabicum

1.6. Material für die Veresterungsversuche

Palmitinsäure (p.A. 0,41) (59 - 62°C Schmelzbereich)

Palmitinsäurechlorid (p.A. 0,55)

Palmitinsäuremethylester, Merck (Bezugssubstanz für die
Gaschromatographie)

Dioxan p.A., Merck

Dicyclohexylcarbodiimid p.A. (DI 318)

Na - Bicarbonat - Lösung (0,05%ig) p.A., Merck

Na - Bicarbonat - Lösung (4n)

Salzsäure (1n) min. 32% (etwa 1,16) p.A., Merck

Na - Sulfat, wasserfrei, p.A.

Buttersäure (BU 349), Merck

1.7. Material zur Bereitung der Sprühreagenzien

Ninhydrin, feinkristallin, p.A.

Wismutnitrat, basisch, crist. $(\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 + 5\text{H}_2\text{O})$

Kaliumjodid, neutral, p.A.

Ammoniummolybdat, gepulvert, Merck

Perchlorsäure 70% (etwa 1,67), Merck

2. Methoden

2.1. Gewinnung des Lipidrohextraktes

Zu 1 kg gemahlenem Mohn wurden 2l Aceton gegeben und dieses Gemisch anschließend 3-4 Std. intensiv gerührt, wobei darauf zu achten war, daß die gesamte Mohnmasse von der Rührschaufel erfasst wurde. Aceton stellt ein geeignetes Lösungsmittel für Fette dar. So konnte nach genügendem Durchmischen der zwei Phasen der Acetonextrakt durch Filtrieren von den festen Partikeln, bestehend aus Kohlehydraten und Fetten, getrennt werden. Das Lösungsmittel wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Die so erhaltenen, acetonfreien, reinen Lipide dienen als Untersuchungsmaterial.

2.2. Nachweis der antilipolytischen Aktivität

2.2.1. Bereitung der Substanzen

Olivensemulsion: 18,5g Gummi arabicum werden mit 250 ml Aqua dest 5 min. lang im Mixer gerührt; danach werden 250 ml Olivenöl hinzugefügt und nochmals, je 5 min. langsam, dann schnell gemischt.

0,05n NaOH: Durch Auffüllen einer Originalpackung Titrisol auf 1000 ml Aqua dest erhält man 1n NaOH. Füllt man 50 ml davon wiederum auf 1000 ml Aqua dest auf, so erhält man die gewünschte 0,05n NaOH.

Trispuffer: 6,057g Trihydroxymethylaminomethan werden in 900 ml Aqua dest gelöst und die Lösung mit 1n HCL auf pH=8 eingestellt; anschließend wird auf 1000 ml Aqua dest aufgefüllt.

Thymolphthalein: 5g Thymolphthalein werden mit 96%igem Äthanol auf 250 ml aufgefüllt (Stammlösung). Zur Herstellung der Gebrauchslösung werden 40 ml Stammlösung mit 500 ml 96%igem Äthanol vermischt.

Lipidemulsion: 3g Gummi arabicum werden mit 40 ml Aqua dest 5 min. lang im Mixer gerührt. Nach Zugabe einer kleinen, stets relativ gleichen Menge des Lipidohextraktes folgt noch 5 minütiges Homogenisieren.

2.2.2. Ansätze

Die Olivenölemulsion stellt das Substrat für die Lipas dar. Sie wird mit dem Inkubationspuffer jeweils vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt. Die durch die Lipaseaktivität freigesetzten Fettsäuren werden durch Titration mit 0,05n NaOH quantifiziert. Nimmt die, bei einer Titration verbrauchte Menge an NaOH nach Zusatz der Lipidemulsion ab, so ist das ein Beweis für die antilipolytische Aktivität der Lipidemulsion. Da sowohl Substrat- als auch Lipidemulsion titrierbare Eigenacidität enthalten können, sind Substrat- und Lipidleerwerte mitzuführen.

I Substratleerwert: 10 ml Substrat - Puffermischung + 1 ml Thy-molphthalein (= Th.)

II Lipidleerwert: 10 ml Lipidemulsion + 1 ml Th.

III Lipasevergleichswert: 10 ml Substrat - Puffermischung +
2 ml Enzym in 2 ml H₂O + 1 ml Th.

IV Hemmansatz: 5 ml Lipidemulsion + 2 mg Enzym in 2 ml H₂O
(15 min. Vorinkubation) + 10 ml Substrat -
- Puffermischung

Alle Ansätze werden 30 min. im Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend nach Zugabe von jeweils 1 ml Th. mit 0,05n NaOH titriert.

2.2.3. Auswertung

Reine Lipasewirkung: Ansatz III - Ansatz I (entspricht 100%)

Hemmwirkung: Ansatz IV - (Ansatz I+II) (" x%)

Erzielbare Hemmung: $100\% - \frac{100 \times I}{II}$

Beispiel: I Substratleerwert: 3,9 (ml verbrauchte NaOH)

II Inhibitorleerwert: 2,3 "

III Lipasevergleichsw: 6,3 "

IV Hemmansatz: 7,4 "

Reine Lipasewirkung: $III - I: 6,3 - 3,9 = 2,4$ (entspr. 100%)

Hemmwirkung: $IV - (I + II): 7,4 - (3,9 + 2,3) = 1,2$ (entspr. x%)

Erzielbare Hemmung: $100\% - \frac{100 \times 1,2}{2,4} = 100\% - 50\% = 50\%$

Mit der, in diesem Beispiel eingesetzten Lipidmenge von 0,8273g, ist eine relative Hemmwirkung von 50% zu erreichen.

2.3. Versuche zur Isolierung des Hemmstoffes

2.3.1. Dünnschichtchromatographisches Verfahren

2.3.1.1. Herstellung der Kieselgelplatten

35g Kieselgel werden mit 80 ml Aqua dest vermischt und so lange gerührt, bis keine Klumpenbildung mehr auftritt. Mit Hilfe einer Rollvorrichtung wird diese Masse möglichst gleichmäßig auf fünf Glasplatten verteilt. Nach kurzem Antrocknen an der Luft (ca. 5 min.) werden die Platten 24 St. im Trockenschrank auf 100°C erhitzt. Vor Gebrauch müssen die Platten abkühlen.

2.3.1.2. Verwendung der Kieselgelplatten

Auf leicht vorgezeichneten Startpunkten werden ein paar Tropfen einer verdünnten Lipidfraktion aufgetragen. Anschließend bringt man die Platten senkrecht in eine geschlossene Wanne, die mit 100 ml eines jeweils geeigneten Laufmittels gefüllt ist. Hat das Laufmittel die Fließmittelfront erreicht, werden die Platten - nach Verdampfen des Laufmittels an der Luft - mit Dichlorfluorescein besprüht. Im UV-Licht können dann die

Lipidflecke lokalisiert werden. Nach dieser Methode wurde aus einer Reihe von Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen das ermittelt, wodurch man die differenzierteste Auftrennung der Lipide erhält. (P/D/E:9/1/0,1)

2.3.2. Säulenchromatografisches Verfahren

Material: Glassäule von 5x50 cm mit Glasfritte und Olive

Zur Säuberung und Anfeuchtung der Säule ist es notwendig, sie zweimal mit dem nachher verwendeten P/D-Gemisch durchlaufen zu lassen. Das Kieselgel wird in dem Lösungsmittel angerührt und in flüssigem Zustand in die Säule gefüllt. Die Höhe der Säulenfüllung soll 40 cm betragen. Nach Einbringen des Säulenmaterials läßt man nochmals 3l Lösungsmittel durchlaufen. Vor Gebrauch soll die Säule mindestens 24 St. stehen.

2.3.2.2. Inbetriebnahme der Säule

Will man das Probematerial auf die Säule aufbringen, so läßt man das Lösungsmittel bis zum oberen Rand der Säulenfüllung ablaufen, legt ein Filter ein und gibt darauf 50g des Lipidextraktes. Erst wenn die Substanz fast vollständig in die Säulenfüllung eingedrungen ist, kann die Säule vorsichtig mit Lösungsmittel aufgefüllt werden. Im weiteren Verlauf ist strengstens darauf zu achten, daß die Säule nie trocken steht. Die Säule wird an einen Fraktomaten angeschlossen. Stimmt man die Tropfgeschwindigkeit der Säule (8 Tropfen/10 sec) und die Wechselzahl des Fraktomaten aufeinander ab, so erhält man pro Reagenzglas das selbe, gewünschte Volumen.

2.3.2.3. Gewinnung und Verarbeitung der einzelnen Fraktionen

Nach dieser Methode der fraktionierten Eluierung werden Fraktionsvolumina zu je 20 ml erhalten. Aus jeder dritten Fraktion werden gleiche Mengen auf Dünnschichtplatten aufge-

tragen und nach dem oben beschriebenen Verfahren die lipidhaltigen Fraktionen lokalisiert. Fraktionen, die Lipide mit gleichem oder ähnlichem R_F -Wert aufweisen, werden vereinigt; aus den so erhaltenen fünf Fraktionen wird das Lösungsmittel abgedampft und jede einzelne Fraktion, wie oben beschrieben, auf ihre Lipasehemmwirkung geprüft.

2.3.3. Versuch zur weiteren Auftrennung der antilipolytischen Fraktion

Wie das Ergebnis der Reinheitsprüfungen zeigt, konnte mit Hilfe des dünnsschichtchromatografischen Verfahrens keine weitere Auftrennung erreicht werden.

2.4. Versuche zur Charakterisierung des Hemmstoffes

2.4.1. Alkalische Hydrolyse

Es wird 1 ml des Lipidrohextraktes in 50 ml 2n NaOH gelöst; dieses Gemisch läßt man über Nacht rühren und schüttelt es anschließend im Scheidetrichter mit Äther aus. Die Natronlauge wird abgeblasen und der Äther verdampft. Der Lipidextrakt wird in üblicher Weise auf seine antilipolytische Aktivität hin geprüft. Durch das Einwirken der Natronlauge ist die Hemmwirkung völlig aufgehoben.

2.4.2. Phosphatid - Nachweise

Diese Nachweise wurden mit Hilfe des dünnsschichtchromatografischen Verfahrens geführt. Dabei soll geprüft werden, ob der Inhibitor eine Phospholipidkomponente aufweist.

Laufmittel: Chloroform/Methanol/ H_2O = 65/25/4

Lösungsmittel für das Lipid: Petroläther

Die Nachweismethoden unterscheiden sich in der Verwendung verschiedener Sprühreagenzien:

Ninhydrinlösung: Bereitung: 0,2g Ninhydrin werden in 100 ml

Äthanol gelöst; die damit besprühten Platten werden auf 110°C erhitzt und zwar bis zur optimalen Entwicklung der Farbflecke. Ninhydrinlösung dient zum Nachweis von Amino-phosphatiden.

Dragendorff - Lösung: Bereitung: Lösung a: 0,85 g basisches Wismutnitrat werden in 100 ml Eisessig und 40 ml H_2O gelöst.

Lösung b: 8g Kaliumjodid werden in 20 ml H_2O gelöst.

Vorratslösung: Gleiche Volumina von a) und b) werden gemischt; diese Lösung ist in dunkler Flasche gut haltbar.

Sprühlösung: Vor Gebrauch wird 1 ml Vorratslösung mit 2 ml Eisessig und 10 ml H_2O gemischt.

Das Dragendorffreagenz ist in diesem speziellen Fall charakteristisch für cholinhaltige Phosphatide; im Allgemeinen dient es zum Nachweis von Alkaloiden und anderen stickstoffhaltigen Verbindungen.

Ammoniummolybdat - Perchlorsäure: Bereitung: 0,5g Ammoniummolybdat werden in 5 ml H_2O gelöst; hinzugefügt werden 1,5 ml HCL (25%ig) und 2,5 ml Perchlorsäure (70%ig).

Nach Abkühlen der Lösung auf Zimmertemperatur wird mit Aceton auf 50 ml aufgefüllt. Die Lösung muss vor Gebrauch 1 Tag stehen und ist nur 3 Wochen haltbar. Die besprühten Platten werden 5 - 10 min auf 110°C erhitzt. Ammoniummolybdat - Perchlorsäure ist von den drei aufgeführten Reagenzien am wenigsten spezifisch; es dient zum Nachweis aller Phospholipide. Aber auch dieser Versuch verlief, ebenso wie die beiden anderen, völlig negativ. Bei Betrachtung im UV - Licht konnten keine Lipidflecke lokalisiert werden, wodurch der Nachweis erbracht ist, daß es sich beim Inhibitor um ein unpolares, weder phosphor- noch aminhaltiges Lipid handelt.

2.4.3. Versuche zur Unterscheidung von Tri-, Di-, und Monoglyceriden.

Alle folgenden Versuche beruhen auf dem Prinzip der Veresterung eventuell vorhandener freier Hydroxyd-Gruppen.

2.4.3.1. Veresterung mit Palmitinsäure

Lösungsmittel: Dioxan

Reagens: Dicyclohexylcarbodiimid

200 mg des Reagens' und 280 mg Palmitinsäure werden in 50 ml Dioxan gelöst. Der Ansatz muß 2 St. stehen. Er wird dann mit Aqua dest aufgefüllt und nochmals stehengelassen. Sind freie OH - Gruppen vorhanden, so bildet das, bei der Veresterung abgespaltene, H_2O mit dem Reagens Dicyclohexylharnstoff, der ausfällt. Zur Entfernung überschüssiger Palmitinsäure wird der Rückstand mit Äther und 0,05%iger Bicarbonatlösung ausgeschüttelt. Die Ätherphase wird isoliert und der Äther abgedampft. Der anschließend wie üblich durchgeführte Test auf antilipolytische Aktivität war in seinen Ergebnissen durch die noch vorhandene Palmitinsäure verfälscht.

Versuch zur Entfernung der überschüssigen Palmitinsäure

Nach Abfiltrieren des Harnstoffes und Verdampfen des Dioxans wird der Rückstand folgender Behandlung unterzogen:

Aufnehmen in 100 ml Eisessig

3 x waschen mit 4n $NaHCO_3$

3 x " " 1n HCL

3 x " " H_2O

Die Essigesterschicht wird mit Natriumsulfat getrocknet und abfiltriert. Wie das Testergebnis zeigt, konnte die überschüssige Palmitinsäure auch mit Hilfe dieser differenzier-ten Behandlungsweise nicht entfernt werden.

2.4.3.2. Veresterung mit Palmitinsäurechlorid

Lösungsmittel: Methanol

Reagens

Veresterungsmittel Palmitinsäurechlorid

Kommt es in diesem Fall zur Veresterung freier OH - Gruppen, so wird anstatt H_2O jetzt HCl abgespalten, die mit 0,5n NaOH neutralisiert wird. In Bezug auf die Ergebnisse des Hemmtestes kann auch hier keine klare Aussage gemabht werden.

2.4.3.3. Veresterung mit Buttersäure

Lösungsmittel: Dioxan

Reagens: Dicyclohexylcarbodiimid

2 ml Buttersäure und 400 mg Dicyclohexylcarbodiimid werden in 50 ml Dioxan gelöst. Die Weiterverarbeitung erfolgt wie unter 2.4.3.1. beschrieben.

D Diskussion

Zusammenfassung

Im Verlaufe der Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß im Samen des Schlafmohns ein Lipid enthalten ist, das Pan-kreaslipase zu hemmen vermag. Durch Verteilungschromatografie wurde ein reines Lipid erhalten. Die Frage nach der Zusammensetzung des Hemmstoffes aus Tri-, Di- und Monoglyceriden konnte noch nicht restlos geklärt werden. Es handelt sich nicht um ein reines Triglyceridgemisch. Die Klärung des quantitativen Anteils an Di- und (oder) Monoglyceriden bleibt folgenden Arbeiten überlassen. Die Enzymhemmung ist eine Sofortreaktion. Auch bei längerer Inkubationszeit ist kein Nachlassen der Hemmwirkung zu beobachten; das Lipid vermag das Enzym permanent zu hemmen. Alkalische Hydrolyse führt zum Verlust der Hemmwirkung.

Sieht man die Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich zu den in der PI - Forschung erzielten, so zeichnen sich viele Parallelen in Bezug auf die Wirkungsweise ab. Bereits der erste Analogieschluß erwies sich als richtig: PI finden sich in eiweißreichen Pflanzensamen, LI dementsprechend in fettreichen. Ebenso wie bei den hochmolekularen, pflanzlichen PI ist die Hemmwirkung bei dem hier isolierten LI permanent. Auch der Verlauf der Hemmkurven der beiden verschiedenen Inhibitorgruppen weist nahezu Übereinstimmung auf. Die Art der Hemmung zeigt kompetitiven Charakter.

Literaturverzeichnis

1. Hochstrasser, K., Feuth, H., Werle, E., (1972) Z. Physiol. Chem. 353, 855-860
2. Karlson, P., (1970) 66-72
3. Werle, E., Zickgraf-Rüdel, (1972) Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 10, 139-150
4. Hochstrasser, K., Werle, E., (1969) Z. Physiol. Chem. 350, 249-254
5. Hochstrasser, K., Muss, M., Werle, E., (1967) Z. Physiol. Chem. 348, 1337-1340
6. Ozawa, K., Laskowsky, M. jr., (1966) J. Biol. Chemistry 241, 3955
7. Hochstrasser, K., Schwarz, S., Illchmann, K., Werle, E., (1968) Z. Physiol. Chem. 349, 1449-1455
8. Tschesche, H., (1967) Z. Physiol. Chem. 348, 1216-1218
9. Tschesche, H., (1967) Z. Physiol. Chem. 348, 1653-1659
10. Fritz, H., Fink, E., Gebhard, M., Hochstrasser, K., Werle, E., (1969) Z. Physiol. Chem. 350, 933-944
11. Hoppe-Seyler-Thierfelder (1966) Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse, VI, B, 877-921
12. Desnuelle, P., Constantin, M. J., Sarda, L., (1956) Bull. Soc. Chim. Biol. 38, 625-631
13. Myers, D. K., Schotte, A., Boer, H., Borsje-Bakker, H., (1955) Biochim. J. 61, 521-528
14. Bamann, E., Gebler, H., (1960) H.S. 319, 180
15. Sarda, L., Desnuelle, P., (1958) Biochim. Biophys. Acta 30, 513-521
16. Sarda, L., Marchis-Mouren, G., Desnuelle, P., (1957) Biochim. Biophys. Acta 24, 425-427
17. Sarda, L., Marchis-Mouren, G., Constantin, M. J., Desnuelle, P., (1957) Biochim. Biophys. Acta 23, 264

18. Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors(1971)
(Fritz,H.,Tschesche,H.,) W. de Gruyter, Berlin
19. Braganza,B.M.,Sambray,Y.M.& Sambray,R.Y.,(1970) Eur. J.
Biochem. 13, 410-415
20. Fritz,H.,Hüller,J.,Wiedemann,M.,Werle,E.,(1967) Z. Physiol.
Chem. 348, 405-418
21. Hochstrasser, K.,Reichert,R.,Schwarz,S.,Werle,E.,(1972)
Z.Physiol. Chem. 353, 221-226
22. Hochstrasser,K.,Haendle,H.,Reichert,R.,Werle,E.,(1971)
Z. Physiol. Chem. 352, 954-958
23. Hochstrasser,K.,Bickel,G.,Reichert,R.,Feuth,H.,(1972)
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 10, 450-452
24. Schmidt,H.,(1970) Der Internist 11, 105-110
25. Goebell,H.,(1971) Der Internist 12, 498-504
26. Baden,H.,Jordal,K.,Lund,F.,Zachariae,F.,(1969)
Scand, J. Gastroent. 4, 291-295
27. Flewig,G.,(1971) Habilitationsschrift
28. Shalita,A.R.,Wheatley,V.,(1970) J. Invest. Derm.
54, 413-415
29. Kraus,S.J.,(1968) J. Invest. Derm. 51, 497-501
30. Hassing,G.S.,(1971) J. Invest. Derm. 56, 412

Herrn Priv. Doz. Dr. K. Hochstrasser möchte ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und vor allem für die vielen Anregungen und die stete Hilfsbereitschaft meinen herzlichen Dank sagen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. H. Feuth, der mir während der ganzen Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Priv. Doz. Dr. G. Flewig danke ich für die Überlassung seiner Habilitationsschrift, sowie seine freundliche Beratung

L e b e n s l a u f
=====

Name: Dopfer
Vorname: Ilse
geboren: am 30. Oktober 1948 in Landshut
Vater: Franz Dopfer, Justizamtsrat
Mutter: Ilse Dopfer, geb. Ingerl
Schule: 1955 - 1959 Volksschule Seligenthal, Landshut
1959 - 1968 Neusprachliches Gymnasium,
Seligenthal, Landshut
Studium: 1968 - 1974 Medizinstudium an der
Universität München
Vorphysikum: September 1969
Physikum: April 1971
Staatsexamen: März - September 1974

